



ABSTRACT / ZUSAMMENFASSUNG / ABREGE

04013180.7

Devices and methods for isolating RNA is disclosed herein. In particular, the isolation of total cellular RNA is discussed. Additionally, devices and methods for reducing genomic DNA in a biological sample without introducing harmful contaminants, and without significantly increasing the time required for the overall procedure being performed on a sample are presented.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Gebrauchsmusterschrift**
10 **DE 200 03 080 U 1**

51 Int. Cl.⁷:
C 12 Q 1/68

21 Aktenzeichen:	200 03 080.9
22 Anmeldetag:	19. 2. 2000
47 Eintragungstag:	27. 4. 2000
43 Bekanntmachung im Patentblatt:	31. 5. 2000

DE 200 03 080 U 1

66 Innere Priorität:
100 00 419. 9 07. 01. 2000

73 Inhaber:
Invitek GmbH, 13125 Berlin, DE

74 Vertreter:
Baumbach, F., Dr.rer.nat. Pat.-Ing., Pat.-Ass., 13125
Berlin

54 Testkit zur Isolierung hochreiner total RNA unter selektiver Entfernung kontaminierender DNA

- 57 Testkit zur Isolierung hochreiner total RNA unter selektiver Entfernung kontaminierender DNA gekennzeichnet durch
- a) Lysis Solution R, enthaltend Guanidinisothiocyanat, DTT, Trinatriumcitrat Dihydrat, N-Lauryl Sarcosin, eine Adsorbin-Carrier Suspension, die moriodisperse und homogene Silica-Partikel mit spezifischen Oberflächen von 40-300 m²/g und Partikelgrößen von 30- 100 nm, vorzugsweise 40 nm, aufweist;
 - b) Wash Buffer R I, enthaltend Guanidinisothiocyanat, Tris-HCl, Ethanol;
 - c) Wash Buffer R II, enthaltend Tris-HCl, NaCl, Ethanol;
 - d) Elution Buffer R, der DEPC-behandeltes RNase freies Wasser darstellt;
 - e) feste Phasen;
 - f) Auffanggefäße.

DE 200 03 080 U 1

19.02.00

Testkit zur Isolierung hochreiner total RNA unter selektiver Entfernung kontaminierender DNA

Die vorliegende Anmeldung betrifft einen Testkit zur manuellen sowie teil- bzw. vollautomatisierbaren Isolierung hochreiner total RNA unter selektiver Entfernung kontaminierender DNA unter Verwendung eines neuen Lysepuffersystems.

Die Isolierung von zellulärer total RNA gewinnt in der molekulargenetischen und biomedizinischen Forschung immer mehr an Bedeutung. Neue Technologien, welche das humane Genomprojekt flankieren, wie z.B. die Chiptechnologie ermöglichen generell ein neues Herangehen an bestimmte Fragestellungen. Von besonderem Interesse ist die Analyse komplexer Expressionsmuster genetischer Information auf Ebene transkribierter RNA. Eine solche Analyse benötigt zelluläre total RNA hoher Reinheit als Ausgangsmaterial. Weitere wichtige Anwendungen betreffen z.B. Fragestellungen eines gezielten An- und Ausschaltens von Targetgenen und der nachfolgenden Analyse zellulärer Pathways. Aus diesem Grunde kommt einem Verfahren zur Isolierung von zellulärer total RNA, welches teil- bzw. vollautomatisierbar ist, eine große Bedeutung zu.

Neben der potentiellen Automatisierbarkeit eines Verfahrens zur Isolierung von total RNA ist es essentiell, Kontaminationen der isolierten total RNA mit genomischer DNA zu verhindern. Dieses Problem kann von z.Z. Verwendung findenden Testsystemen nur ungenügend bzw. nur mit einem erheblichen finanziellen und zeitlichen Mehraufwand durch den Einsatz von DNA verdauenden Enzymen realisiert werden. Darüber hinaus ist ein solcher enzymatischer Verdau genomischer DNA sehr schwer automatisierbar.

Der vorliegende Testkit löst die genannten Probleme. Er ermöglicht sowohl die effiziente Lyse des zur Isolierung der RNA ausgewählten Ausgangsmaterials (z.B. Zellen oder Gewebe) als auch die Adsorption störender DNA unter Verwendung eines neuartigen Lysepuffers. Der Testkit umfasst neben Waschpuffern weiterhin feste Phasen, an die die DNA und RNA getrennt gebunden werden.

Der erfindungsgemäße Testkit ist gekennzeichnet durch:

DE 200 03 080 U1

19.02.00

- a) Lysis Solution R (enthaltend Guanidinisothiocyanat, DTT, Trisnatriumcitrat Dihydrat, N-Lauryl Sarcosin, und eine Adsorbin-Carrier Suspension, die monodisperse und homogene Silica-Partikel mit spezifischen Oberflächen von 40 – 300 m²/g und Partikelgrößen von 30 – 100 nm, vorzugsweise 40 nm aufweist);
- b) Wash Buffer R I (enthaltend Guanidinisothiocyanat, Tris-HCl, Ethanol)
- c) Wash Buffer R II (enthaltend Tris-HCl, NaCl, Ethanol)
- d) Elution Buffer R (DEPC-behandeltes RNase freies Wasser)
- e) feste Phasen zur Bindung von DNA und RNA, wie z.B. Filtrationssäulchen (Spin Filter) mit Glasfaservlies oder Mikrotiterfilterplatten im 96 bzw. 384-Well-Format mit Glasfaservlies
- f) Auffanggefäße, wie z.B. Auffangplatten (Collection Plate) im 96 bzw. 384-Well-Format
- g) ggf. Binding Buffer R (enthaltend 70 %iges Ethanol).

Die Zusammensetzung des neuen Lysepuffers ermöglicht nach der Lyse des Ausgangsmaterials die hochselektive Adsorption der in der Probe enthaltenen genomischen DNA an das eingesetzte Adsorbin. In einem nachfolgenden Zentrifugations- oder Vakuumfiltrationsschritt wird die gebundene genomische DNA an einer festen Phase (z.B. Glasvlies in einer Filterkartusche oder 96-Well-Filterplatte) vom RNA-enthaltenden Lysat abgetrennt und verworfen. Das RNA-enthaltende Lysat wird mit definierten Anteilen von Ethanol gemischt und auf eine neue Filterplatte oder Filterkartusche (Glasvlies) überführt und nachfolgend wiederum durch Anlegen von Vakuum oder Zentrifugation die RNA aus dem Lysat an die feste Phase gebunden. Die gebundene RNA wird nachfolgend mit zwei verschiedenen Waschpuffern gewaschen und das Vlies mittels Vakuum oder Zentrifugation vom restlichen Ethanol befreit. Die Elution der RNA erfolgt durch die Zugabe von DEPC-behandeltem Wassers und nachfolgendem Anlegen von Vakuum bzw. durch eine Zentrifugation. Die so isolierte RNA steht nun weiteren Applikationen zur Verfügung.

Entscheidender Vorteil des Testkits besteht in der selektiven Entfernung der genomischen DNA, wobei die Effizienz der Entfernung der genomischen DNA über die Bindung an die im Lysepuffer enthaltenen Adsorbin-Carrier und der nachfolgenden Filtration über ein Glasvlies deutlich über einem sehr kostenintensiven und zeitverbrauchenden DNase I-Verdau deutlich besser ist.

DE 200003080 U1

19.02.00

Ausführungsvarianten des neuen Testkit zur Isolierung hochreiner total RNA unter selektiver Entfernung kontaminierender genomischer DNA sowie zwei detaillierte Ablaufprotokolle werden nachfolgend aufgeführt.

A. Testkit zur manuellen Isolierung hochreiner total RNA

1. Bestandteile

Lysis Solution R (Guanidinisothiocyanat; DTT, Tri-Natriumcitrat Dihydrat; N-Lauryl Sarcosin; Adsorbin-Carrier Suspension – wässrige Suspension aus monodisperse und homogene Silica-Partikel mit spezifischen Oberflächen von 40 – 300 m²/g und Partikelgrößen von 30 – 100 nm, vorzugsweise 40 nm)

Wash Buffer R I (Guanidinisothiocyanat; Tris-HCl; Ethanol)

Wash Buffer R II (Tris-HCl; NaCl; Ethanol)

Elution Buffer R (DEPC-behandeltes RNase freies Wasser)

Filtrationssäulchen (Spin Filter) mit Glassfaservlies

Auffanggefäße

2. Ablaufprotokoll:

1. Zugabe von Lysis Solution R zum Ausgangsmaterial und Mischen der Probe z.B. durch mehrfaches auf und ab pipettieren.
2. Überführen des Lysates auf einen Spin Filter zur Entfernung von genomischer DNA. Inkubation für 1 min und anschließende Zentrifugation für 2 min bei 12.000 U/min. Verwerfen des Spin Filters.
3. Zugabe von einem Volumen an 70 %igem Ethanol zum erhaltenen RNA-haltigen Lysat (Filtrat aus Schritt 2). Gründliches Mischen mittels einer Pipette.
4. Überführen des Lysates auf einen neuen Spin Filter zur RNA-Bindung. Inkubation für 1 min. Zentrifugation für 30 sec bei 10.000 U/min. Filtrat verwerfen und Säule wieder in das Auffanggefäß einsetzen.

DE 200 03 080 U1

19.02.00

5. Zugabe von 600 µl Wash Buffer R I und Zentrifugation für 30 sec bei 10.000 U/min. Filtrat verwerfen und wieder in das Auffanggefäß einsetzen.
6. Zugabe von 500 µl Wash Buffer R II und Zentrifugation für 30 sec bei 10.000 U/min. Filtrat verwerfen und Spin Filter wieder in das Auffanggefäß einsetzen. Waschschrift wiederholen. Zur Entfernung des restlichen Ethanol 3 min bei mindestens 12.000 U/min zentrifugieren.
7. Spin Filter in ein RNase-freies 1,5 ml-Auffanggefäß einsetzen und Zugabe von 40-100 µl Elution Buffer R. Inkubation für 2 min und anschließende Zentrifugation für 1 min bei 10.000 U/min. Spin Filter verwerfen und eluierte total RNA sofort auf Eis.

B. Testkit zur teil- bzw. vollautomatisierten Isolierung hochreiner total RNA im Mikrottestplattenformat

1. Bestandteile

Lysis Solution R (Guanidinisothiocyanat; DTT, Tri-Natriumcitrat Dihydrat; N-Lauryl Sarcosin; Adsorbin-Carrier Suspension

Binding Buffer R (70 %iges Ethanol)

Wash Buffer R I (Guanidinisothiocyanat; Tris-HCl; Ethanol)

Wash Buffer R II (Tris-HCl; NaCl; Ethanol)

Elution Buffer R (DEPC-behandeltes RNase freies Wasser)

Mikrottest-Filterplatten im 96-Well-Format mit Glasfaservlies

Auffangplatten (Collection Plate) im 96-Well-Format (0,5 ml, 1 ml, 2 ml Beladungsvolumina)

2. Ablaufprotokoll:

Total RNA-Extraktion unter Nutzung einer Kombination aus Vakuum-Block und Zentrifuge

- 1.) Die zur total RNA-Extraktion vorgesehenen Zellen befinden sich in den Kavitäten einer 96-Well-Platte(Mikrottestplatte). Zugabe von 150 µl Lysis

DE 200 03 080 U1

19.02.00

Solution R in jede Kavität der 96-Well-Platte. Gründliches Schütteln der 96-Well-Platte mit einem Schüttler für Mikrotestplatten bzw. manuell (für manuelles Schütteln die Platte flach auf einer ebenen Unterlage bewegen). Alternativ kann die Mischung auch mit einer Mehrkanalpipette erfolgen.

- 2.) Eine 96-Well-Filterplatte (für DNA-Entfernung) auf die 1,0 ml Collection Plate aufsetzen. Überführung der Lysate aus Schritt 1 (150 µl) in die Kavitäten der Filterplatte und Inkubation für 1 min. Die Filterplatte mit einer Abdeckfolie verschließen. Die Kombination aus Filterplatte/1,0 ml Collection Plate in den Plattenhalter des Rotors stellen und ein entsprechend austariertes Gewicht auf der gegenüberliegenden Seite des Rotors postieren. Zentrifugation für 3 min bei max. 4000 U/min und RT. Filterplatte verwerfen und 1,0 ml Collection Plate aus der Zentrifuge entnehmen.
- 3.) Zugabe von 150 µl Binding Buffer R zu den RNA-haltigen Lysaten in der 1,0 ml Collection Plate. Gründliches Mischen mittels einer Mehrkanalpipette.
- 4.) Abfallbehälter des Vakuum-Blocks (oder alternativ die 2,0 ml Collection-Plate) in den Vakuum-Block einsetzen. Eine neue 96-Well-Filterplatte (für RNA-Bindung) auf den Vakuum-Block stellen. Überführung der Lysate aus Schritt 3 (300 µl) in die Kavitäten der Filterplatte und Inkubation für 1 min. Anschalten der Vakuum-Pumpe und Aufrechterhaltung des Vakuums bis zum kompletten Transfer des Lysates in den Abfallbehälter des Vakuum-Blocks oder alternativ in die 2,0 ml Collection-Plate (Dauer ca. 60 sec). Vakuum abschalten und Belüftung des Vakuum-Blocks.
- 5.) Zugabe von 600 µl Wash Buffer R I in die Kavitäten der Filterplatte. Einschalten der Vakuum-Pumpe und Aufrechterhaltung des Vakuums bis zum kompletten Transfer des Waschpuffers (Dauer ca. 60 sec). Vakuum abschalten und Belüftung des Vakuum-Blocks.
- 6.) Zugabe von 400 µl Wash Buffer R II in die Kavitäten der Filterplatte. Anschalten der Vakuum-Pumpe und Aufrechterhaltung des Vakuums bis zum kompletten Transfer des Waschpuffers (Dauer ca. 60 sec). Vakuum abschalten und Belüftung des Vakuum-Blocks. Erneute Zugabe von 400 µl Wash Buffer R II in die Kavitäten der Filterplatte. Anschalten der Vakuum-Pumpe und Aufrechterhaltung des Vakuums für 10 min zur kompletten

DE 200003080 U1

19.02.00

Entfernung des Ethanols. Vakuum abschalten und Belüftung des Vakuum-Blocks. Filterplatte aus dem Vakuum-Block entnehmen und restliches an den Auslaufstutzen anhaftendes Ethanol durch Aufdrücken der Filterplatte auf einen Stapel saubere Papiertücher entfernen.

- 7.) Filterplatte auf die sterile 0,5 ml Collection Plate aufsetzen. Zur Elution der total RNA 60-80 µl Elution Buffer R (RNase-frei) in die Kavitäten der Filterplatte pipettieren (direkt auf die Membran). Inkubation für 2 min. Die Filterplatte mit einer Abdeckfolie verschließen. Die Kombination aus Filterplatte/0,5 ml Collection Plate in den Plattenhalter des Rotors stellen und ein entsprechend austariertes Gewicht auf der gegenüberliegenden Seite des Rotors postieren. Zentrifugation für 3 min bei max. 4000 U/min und RT.

Die isolierte RNA steht nun weiteren Applikationen zur Verfügung.

DE 200 03 080 U1

19.02.00

Ansprüche

1. Testkit zur Isolierung hochreiner total RNA unter selektiver Entfernung kontaminierender DNA gekennzeichnet durch
 - a) Lysis Solution R, enthaltend Guanidinisothiocyanat, DTT, Trinatriumcitrat Dihydrat, N-Lauryl Sarcosin, eine Adsorbin-Carrier Suspension, die monodisperse und homogene Silica-Partikel mit spezifischen Oberflächen von 40 – 300 m²/g und Partikelgrößen von 30 – 100 nm, vorzugsweise 40 nm, aufweist;
 - b) Wash Buffer R I, enthaltend Guanidinisothiocyanat, Tris-HCl, Ethanol;
 - c) Wash Buffer R II, enthaltend Tris-HCl, NaCl, Ethanol;
 - d) Elution Buffer R, der DEPC-behandeltes RNase freies Wasser darstellt;
 - e) feste Phasen;
 - f) Auffanggefäße.
2. Testkit nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass er Binding Buffer R, der 70%iges Ethanol enthält, aufweist.
3. Testkit nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass er als feste Phasen Filtrationssäulchen mit Glasfaservlies aufweist.
4. Testkit nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass er, als feste Phasen Mikrotestfilterplatten im 96 Well-Format mit Glasfaservlies aufweist.
5. Testkit nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass er als feste Phasen Mikrotestfilterplatten im 384 Well-Format mit Glasfaservlies aufweist.

DE 200 03 080 U1